

## 人脂肪间充质干细胞永生化 (CD90 免疫荧光鉴定)

### 一、细胞简介

货号	YFX-CLH202
背景描述	<p>人脂肪间充质干细胞永生化分离自脂肪组织；脂肪间充质干细胞 (adipose-derived stemcells, ADSCs)源自于胚胎发育时期的中胚层，是一类具有自我更新和多分化潜能的成体干细胞。其可以在特定的条件下诱导分化为脂肪、骨、软骨、胰岛 <math>\beta</math> 细胞和心肌等多种细胞，另外其免疫原性较低，因此，广泛应用于临床；与骨髓间充质干细胞相比，在来源、细胞群特点以及分化潜能等多方面极为相似。但是，脂肪干细胞更易获得足够的细胞数量切对患者损伤较小，是更为理想的字体干细胞源。脂肪组织分离得到脂肪干细胞，脂肪干细胞形态以梭形为主。BrdU 可标记其核。</p> <p><b>该细胞通过慢病毒转染的方式携带 SV40 基因。</b></p>
细胞形态	长梭形细胞样，不规则细胞样，贴壁生长。
规格	$>5 \times 10^5$ ceLLs, T25 瓶或者 1mL 冻存管包装。
细胞来源	人脂肪组织。
培养基	人脂肪间充质干细胞专用完全培养基。
培养条件	气相：空气，95%；二氧化碳，5%； 温度：37℃； 培养箱湿度为 70%-80%。
细胞检测	不含有 HIV-1、HBV、HCV、支原体、细菌、酵母和真菌等。
传代比例	1:2-1:5；第一次收到细胞建议 T25 培养瓶 1: 2 传代。
换液频率	1-2 天。
细胞冻存液	无血清冻存液。

### 二、细胞收到后处理方式

- 收到细胞后，75%酒精消毒瓶壁将 T25 瓶置于 37℃ 培养箱放置约 2-3h，若发现培养瓶破损、有液溢出及细胞有污染，请拍照后及时联系我们。
- 请在 4 或 5×显微镜下确认细胞状态，同时给刚收到的细胞拍照 (10×, 20×) 各 2-3 张以及培养瓶外观照片一张留存，作为售后时收到时细胞状态的依据。
- 贴壁细胞：细胞在 37℃ 培养箱中放置 2-3h，显微镜下观察细胞的生长和贴壁情况，有些贴壁细胞在快递运送过程中会因振动脱落和脱落后成团的情况。若镜下观察细胞的生长密度若在 60%以下，可去除培养瓶中灌液培养基 (若有未贴壁的细胞需要离心回收，重悬打入到原培养瓶中)，加入新配制的完全培养基 6-8mL，放到细胞培养箱中继续培养。若细胞生长密度达 70%-80%以上，可以对细胞进行传代处理。传代过程中，若因运输振动脱落的细胞需要离心回收。
- 备注：运输用的培养基不能再用来培养细胞，请换用按照说明书细胞培养条件新配制的完全培养基来培养细胞。收到细胞后第一次传代建议 T25 培养瓶 1: 2 传代。

### 三、细胞传代 (建议一传二)

对于贴壁细胞传代可以参考以下方法：

- 在生物安全柜内，打开培养瓶瓶口，吸弃瓶内的培养基。
- 向培养瓶内加入 3mL 无菌的 1×PBS，水平放置培养瓶，使 PBS 能够浸润到培养瓶底面上所有的面积，吸弃 PBS。

3、向瓶内加入 1mL 0.25% 胰蛋白酶 (含 EDTA) , 浸润底面后放入 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 1~2min。

4、孵育完成后在倒置显微镜下观察细胞是否变圆飘起, 若全部消化下来则直接向培养瓶内加入 2mL 完全培养基中, 将悬液吸入 15mL 离心管。

**注: 如细胞不能一次性完全消化, 可采取如下方法:**

A. 准备一个无菌的 15mL 离心管, 加入 2mL 完全培养基。

B. 将消化下来的细胞加入到上述离心管中。

C. 向之前消化的培养瓶中加入 1mL 胰酶继续消化 2min 左右, 轻拍培养瓶, 95%左右细胞脱落后加入 2mL 含 10%FBS 的完全培养基中和, 中和后的细胞悬液移入 A 中的离心管内。

#### 四、细胞冻存

收到细胞后建议在培养前 3 代时冻存一批细胞种子以备后续实验使用。下面 T25 瓶为例:

1、选择指数生长期的细胞, 吸去培养液, 加 PBS 清洗 1-2 遍。去 PBS, 加入 0.25% 胰酶 1.5mL 润洗 10 秒, 去胰酶。将培养瓶放 37 度培养箱, 靠残余胰酶继续消化细胞直至细胞变圆, 拍打瓶侧使细胞脱落。细胞消化下来后, 加 5mL 培养液全部吹打下来, 再 1000RPM 离心 3 分钟。

2、加入 1-1.5mL 成品冻存液, 分装至 2mL 冻存管里, 将冻存管放入充满异丙醇的程序降温盒中, 之后转入-80°C 度冰箱过夜, 第二天再转至液氮。

#### 五、细胞复苏

1、将恒温水浴锅中的水预热到 37°C。

2、准备一支 15mL 离心管, 加入 5mL 完全培养基, 放入 37°C 水浴锅中预热。

3、戴上护目镜, 厚毛线手套后, 从液氮罐中取出要复苏的细胞, 尽快转入 37°C 恒温水浴锅中复温晃动冻存管以提高复温速率。

4、将融化了的冻存管中的细胞吸入事先准备的离心管中, 混匀后, 1000rpm 离心 5min。

5、准备一个 T-25 培养瓶, 写上细胞名称、日期, 再加入 4mL 完全培养基。

6、离心完成后弃去上清, 用 1mL 完全培养基重悬细胞后, 转入 T-25 细胞培养中, 混匀后转入 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养静置。

#### 六、运输和保存

1、T25 瓶复苏的存活细胞常温发货, 收到细胞后请镜下观察细胞生长状态, 如铺瓶率超过 85%请立即进行传代操作。

2、1mL 冻存细胞悬液装于 1.8mL 的冻存管中, 置于装满干冰的泡沫保温盒中进行运输; 收到细胞后请尽快解冻复苏细胞进行培养, 如无法立刻进行复苏操作, 冻存细胞可在-80°C 的条件下保存 1 个月。

#### 七、注意事项

1、所有动物细胞均视为有潜在的生物危害性, 必须在二级生物安全台内操作, 并注意防护, 所有废液及接触过此细胞的器皿需要灭菌后方能丢弃。

2、从液氮中取出细胞冻存管时, 若冻存管内有液氮进入, 需拧松冻存管, 排出内部残留的液氮, 之后拧紧冻存管, 置于干冰上, 然后放入 37°C 水浴中, 避免温差太大造成液氮快速气化而爆炸。